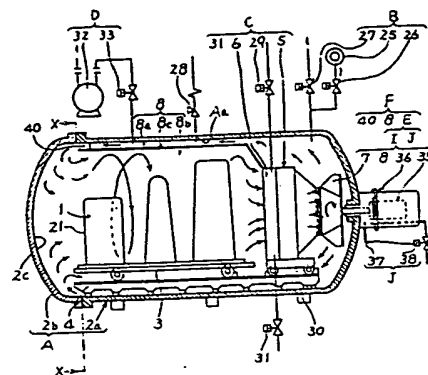


(54) CONTROL OF ROTATIONAL SPEED OF CIRCULATING FAN IN AUTOCLAVE MOLDING

- (11) 3-123636 (A) (43) 27.5.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 64-259608 (22) 4.10.1989
 (71) ASHIDA SEISAKUSHO K.K. (72) MASASHI NAKAJI(1)
 (51) Int. Cl⁵. B01J3/04, B29C35/04// B29K105/08

PURPOSE: To shorten molding time and reduce energy consumption by controlling the rotational speed of a circulating fan according to temp. difference between each of materials to be molded.

CONSTITUTION: Fiber-reinforced plastics for use as structure or structural part of aircraft, spacecraft, industrial apparatus, etc., are molded by use of an autoclave comprising a pressure container A, a pressure applying means B, a heating and cooling means C, a pressure reducing means D, a gas circulating means F, an obstacle temp. control means, etc. Here, the rotational speed of a circulating fan 7 is controlled according to temp. difference between each of materials 1 to be molded, i.e. when the temp. difference between each material 1 becomes large, since the number of revolutions of the circulating fan 7 can be increased to accelerate heat transfer, the forming time can be shortened. When the temp. difference is decreasing, since the number of revolutions of the fan can be reduced, a smaller quantity of circulating gas is required with the accompanying reduction in the load current required for a circulating fan motor, whereby an energy saving effect can be achieved.

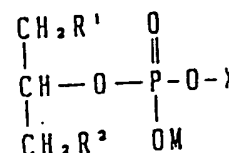
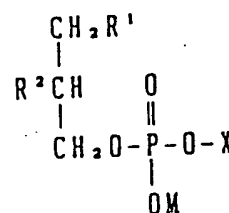


(54) LIPOSOME FORMING AGENT AND LIPOSOME COMPOSITION

- (11) 3-123637 (A) (43) 27.5.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 64-261027 (22) 5.10.1989
 (71) KAO CORP (72) YOSHIKO SENKAWA(4)
 (51) Int. Cl⁵. B01J13/02, A61K9/127, C07F9/10

PURPOSE: To prepare a fine and stable liposome forming agent by a method wherein phosphoric esters are obtained by reaction between a specific glycerophosphoric lipid and a polyhydric alcohol in the presence of phospholipase D and mixed with a water-soluble salt or surfactant.

CONSTITUTION: A mixture of phosphoric esters is obtained by reaction between glycerophosphoric lipid represented by the formula I and/or formula II, wherein R¹ and R² are groups selected from -OCOR³ and/or -OR⁴, wherein R³ and R⁴ are 6-32C alkyl groups, X is an org. residue free from one hydroxyl group at the hydroxyl group contg. base and M is H and alkali metal, and a polyhydric alcohol having a condensation level of 2-50 such as polyglycerol. This mixture of phosphoric esters is mixed with a water-soluble salt and/or surfactant to prepare a liposome forming agent.

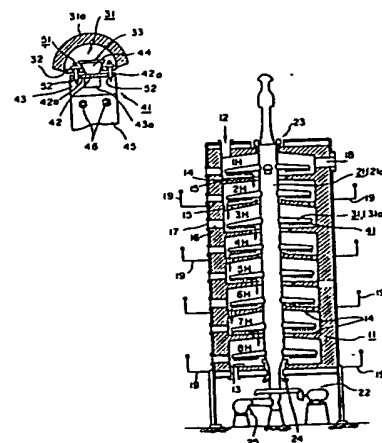


(54) VERTICAL MULTIHEARTH FURNACE

- (11) 3-123638 (A) (43) 27.5.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 64-261949 (22) 9.10.1989
 (71) MITSUBISHI KASEI CORP (72) KAZUO KOMATSU
 (51) Int. Cl⁵. B01J19/18, C01B31/02, C01B31/08, F27B1/10

PURPOSE: To improve productivity with an effective use of materials by a method wherein an arbitrary replacement of a number of stirring teeth held vertically by a stirring arm is made possible at hot stage without interrupting the operation of a furnace and the replacement operation is completed by only replacing the end part of each stirring tooth.

CONSTITUTION: A furnace body 11 is provided in its interior with hearths 14 having central openings and arranged in a multiple tiers and with a work opening 16 at a part thereof corresponding to each hearth 14. A stirring arm 31 is extended in all directions over each hearth 14 from a rotary shaft 21 and a number of stirring teeth 45 is fitted into the slits 33 formed in the underside of each arm 31 in such manner they are directed vertically toward the surface of the hearth 14. There is also provided a stirring assembly 41 which has an attaching piece 44 on the upper surface of a base plate 42 and stirring teeth 55 detachably attached to an attaching plate 43 vertically extending downwardly. The stirring assembly 41 is secured in place by inserting a fixing wedge-shaped rod 51 into an attaching hole at the end part of the arm 31 with the attaching piece 44 detachably fitted into the slit 33 thereof.



⑩ 日本国特許庁(J P)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-123637

⑬ Int. Cl.⁹

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)5月27日

B 01 J 13/02
A 61 K 9/127
C 07 F 9/10

F 7624-4C
Z 8619-4H
8317-4G

B 01 J 13/02

Z

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全9頁)

⑮ 発明の名称 リボソーム形成剤及びリボソーム組成物

⑯ 特 願 平1-261027

⑰ 出 願 平1(1989)10月5日

⑱ 発 明 者 千 川 佳 子 和歌山県有田郡吉備町水尻88
⑱ 発 明 者 伊 藤 隆 司 和歌山県和歌山市金龍寺丁4-1 花王紀和寮
⑱ 発 明 者 増 田 光 晴 和歌山県和歌山市府中187-5
⑱ 発 明 者 黒 崎 富 裕 大阪府泉南郡岬町淡輪1465
⑱ 発 明 者 園 生 純 孝 東京都国立市谷保7026-3
⑲ 出 願 人 花 王 株 式 会 社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
⑳ 代 理 人 弁 理 士 有 賀 三 幸 外2名

明 細 書

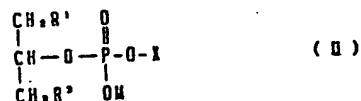
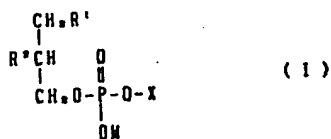
1. 発明の名称

リボソーム形成剤及びリボソーム組成物

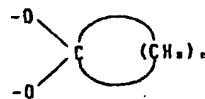
2. 特許請求の範囲

1. (a) ホスホリパーゼDの存在下、次の一般式

(I) 及び/又は (II)



(式(I)及び(II)中、R¹及びR²はそれぞれ、同一又は異なって-OCOR³及び/又は-OR⁴より選ばれる基(但し、R³及びR⁴は同一又は異なって、それぞれ炭素数6~32のアルキル又はアルケニル基を表す)を示すか、又はR¹とR²が一緒になって次の基



(ここで、nは11~19の整数を表す)を形成してもよく、Xは水酸基含有塩基の水酸基1個を除いた後に残る有機残基を示し、Mは水素原子、アルカリ金属、アルカリ土類金属、アンモニウム、アルキルアンモニウム又はアルカノールアンモニウムを示す)

で表されるグリセロリン脂質と下記(1)~(3)

(1) HO-(Y-O)_n-H (ここでnは2~50の整数、Yは炭素数2~4のアルキレン基もしくは置換アルキレン基を示す)で表されるモノ又はポリエーテル

(2) 縮合度2~50のポリグリセリン

(3) 分子内に一級アルコール基2個以上を有する炭素数4~7の単糖類、二糖類又は糖アルコール類

のいずれかの多価アルコールとを反応させて得られるリン酸エステル混合物と、

- (a) 水溶性塩及び／又は界面活性剤 とからなるリポソーム形成剤。
2. 請求項1記載のリポソーム形成剤を用い、有効活性成分を包含せしめたリポソーム組成物。
3. リポソームの平均直径が500nm以下である請求項2記載のリポソーム組成物。
3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は新規なリポソーム形成剤及びリポソーム組成物に関し、更に詳しくは、微細で安定なリポソームを形成する新規リポソーム形成剤及び容易にこれを形成することができる新規なリポソーム組成物に関する。

〔従来の技術及び発明が解決しようとする課題〕

脂質二重膜の一種あるいは多重の球殻からなるリポソームは、薬効成分のキャリアーとして注目されている。リポソームを薬物担体として用い、静脈注射等により生体への投与を目的とするとき、リポソームの粒径は小さい方が望ましいことが多い。リポソーム形成剤としては天然リン脂質がよ

く知られているが、通常、天然リン脂質を水に投入しただけでは粒径の大きな(直径1~5μm)多重膜リポソームを形成し、均一で粒径が小さく安定なリポソーム分散液を得ることはできない。

従来知られている粒径の小さなリポソームの製造法としては、超音波処理による方法、界面活性剤との混合系から透析などにより界面活性剤を除去する方法、脂質のエタノール溶液を水中に注入する方法、逆ミセル法などがある。これらの方法は、例えば、エル・एस・ラオ(L. S. Rao)「リポソーム・テクノロジー(Liposome Technology)」, ジー・グレゴリアディス(G. Gregoriadis)編、CRC Press、Florida、(1984)、第1巻、18章、247-257にまとめられている。しかし、超音波照射法、界面活性剤除去法及び逆ミセル法による小さなリポソームの製造法は、実験室レベルでの調製法にすぎず、工業的大量生産には適さない。また、脂質のエタノール溶液を水中に注入する方法では、低温度のリポソームしか得られないと共に、長期間保存し

ておくと元の大きな多重膜リポソームに戻ってしまうなどの問題があった。

かかる問題点を解決するための種々の研究がなされ、例えば、ニンハム(Ninham)及びエバンス(Evans)、【ファラデー・ディスカス・ケミカル・ソサイエティー(Paraday Discuss Chem. Soc.)、81:1(1986)】には、水酸イオンあるいは酢酸イオンを対イオンとして有するジドデシルジメチルアンモニウムカチオンが、半径約30nmの小さなリポソームを形成することが報告されている。しかし、この方法では小さなリポソームを形成するために必要なリポソーム形成剤の濃度が狭い範囲に限られている。しかも、リポソーム形成物質がカチオン性界面活性剤であるので、生体への投与には適さないものであった。

従って、粒径が小さく、安定で、しかも人体に対して安全なリポソームを工業的に大量生産する方法が望まれていた。

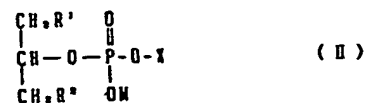
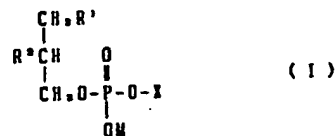
〔課題を解決するための手段〕

本発明らは、このような状況において鋭意検討を重ねた結果、特定のリン脂質と多価アルコールとの反応混合物を使用することにより水に分散させただけで粒径が小さく、しかも安定なリポソームを形成するリポソーム形成剤を得ることに成功し、本発明を完成したものである。

すなわち、本発明は、

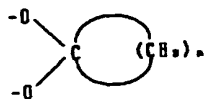
(a) ホスホリパーゼDの存在下、次の一般式

(I) 及び／又は (II)



〔式(I)及び(II)中、R¹及びR²はそれぞれ、同一又は異なって-OCOR³及び／又は-OR⁴より選ばれる基(但し、R³及びR⁴は同一又は異なって、それぞれ炭素数6~32のアルキル又はアルケニル基を表す)を示すか、又はR¹とR²が一緒になって

次の基



(ここで、 n は 1 1 ~ 1 9 の整数を表す) を形成してもよく、 X は水酸基含有塩基の水酸基 1 個を除いた後に残る有機残基を示し、 M は水素原子、アルカリ金属、アルカリ土類金属、アンモニウム、アルキルアンモニウム又はアルカノールアンモニウムを示す]

で表されるグリセロリン脂質と下記 (1) ~ (3)

- (1) $HO-(Y-O)_m-H$ (ここで m は 2 ~ 5 0 の整数、 Y は炭素数 2 ~ 4 のアルキレン基もしくは置換アルキレン基を示す) で表わされるモノ又はポリエーテル
- (2) 縮合度 2 ~ 5 0 のポリグリセリン
- (3) 分子内に一級アルコール基 2 個以上を有する炭素数 4 ~ 7 の単糖類、二糖類又は糖アルコール類
- のいずれかの多価アルコールとを反応させて得ら

オクタコサジエニル、トリアコンタジエニル、ドトリアコンタジエニル、ヘキサデカトリエニル、オクタデカトリエニル、エイコサトリエニル、ドコサトリエニル、テトラコサトリエニル、ヘキサコサトリエニル、オクタコサトリエニル、トリアコンタトリエニル、ドトリアコンタトリエニル、エイコサテトラエニル、ドコサテトラエニル、テトラコサテトラエニル、ヘキサコサテトラエニル、オクタコサテトラエニル、トリアコンタテトラエニル、ドコサペンタエニル、テトラコサペンタエニル、ヘキサコサペンタエニル、オクタコサペンタエニル、トリアコンタペンタエニル、ドトリアコンタペンタエニル、ドコサヘキサエニル、テトラコサヘキサエニル、ヘキサコサヘキサエニル、オクタコサヘキサエニル、トリアコンタヘキサエニル、ドトリアコンタヘキサエニル等が挙げられる。

また水素原子、アルカリ金属、アルカリ土類金属、アンモニウム、アルキルアンモニウム又はアルカノールアンモニウムである M としては、例え

れるリン酸エステル混合物と、

(4) 水溶性塩及び/又は界面活性剤とからなるリポソーム形成剤、及びこれら形成剤を用いて形成するリポソーム内に有効活性成分を包含するリポソーム組成物を提供するものである。

本発明リポソーム形成剤に用いられるリン酸エステル混合物 (以下、リン酸エステル混合物) (4) は、式 (I) 及び/又は (II) のグリセロリン脂質と (1) ~ (3) から選ばれる多価アルコールとを反応させて得られるものであるが、式 (I)、(II) 中、 R^1 、 R^2 で示されるアルキル基又はアルケニル基としては、例えば、ヘキシル、オクチル、デシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、エイコシル、ドコシル、テトラコシル、ヘキサコシル、オクタコシル、トリアコンチル、ドトリアコンチル、2-エチルヘキシル、オクタジエニル、デカジエニル、ドデカジエニル、テトラデカジエニル、ヘキサデカジエニル、オクタデカジエニル、エイコサジエニル、ドコサジエニル、テトラコサジエニル、ヘキサコサジエニル、

ば、カリウム、リチウム、ナトリウム、ベリリウム、マグネシウム、カルシウム、ストロンチウム、バリウム、アンモニウム、トリエタノールアンモニウム、トリメチルアンモニウム、トリエチルアンモニウム等が挙げられる。

一方、(1) に記載の化合物に於いて Y は置換基を有してもよい炭素数 2 ~ 4 のアルキレン基で、例えばエチレン、プロピレン、ブチレン、1-メチルプロピレン等が挙げられ、 m は 2 ~ 5 0 の整数であるが、4 ~ 5 0、特に 4 ~ 2 0 が好ましい。特に好ましいものとしては、例えば、平均分子量 4 0 0 のポリエチレングリコール (以下 PEG400 と記す)、平均分子量 6 0 0 のポリエチレングリコール (以下 PEG600 と記す)、平均分子量 2 0 0 のポリプロピレングリコール (以下 PPG200 と記す) 等が挙げられる。(2) のポリグリセリンの縮合度は 2 ~ 5 0 であるが、4 ~ 5 0 特に 4 ~ 2 0 が好ましい。特に好ましいポリグリセリンとしては例えば、平均分子量 5 0 0 のポリグリセリン (PG500 と記す)、平均分子量 7 5 0 のポリグリセリン

(P6750と記す)等が挙げられる。また、(3)に記載の分子内に一級アルコール基2個以上を有する、炭素数4~7の多価アルコール類のうち、単糖類としては、例えばキシロース、リブロース、フラクトース、ソルボース、ブシコース、タガトース、セドヘプツロース、グルコヘプツロース、マンノヘプツロース等を例示でき、また、二糖類としてはスクロース、マルトース、セロビオース、トレハロース、ラクトース等が例示でき、また、糖アルコールとしては、例えばエリスリトール、リビトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、ガラクトチトール、セドヘプチトール、ベルセイトール等が例示できる。

特に好ましいリン酸エステル混合物(a)としては、R¹及びR²が、例えば、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、オレオイル、リノレオイル、リノレノイル、アラキドノイル、ドコサヘキサノイル、エイコサペンタノイル等の組み合わせからなるか、又は、前記式(1)中、R¹、R²の組成が、例えば、卵黄組成又は大豆組成等、

235(1986)』や特開昭60-41494号等に記載されているホスホリパーゼDが用いられる。

反応に用いられる溶媒としては、エーテル、ベンゼン、クロロホルム等の有機溶媒と適当な水性溶媒との混合溶媒を例示することができる。水性溶媒にはホスホリパーゼDの作用を促進したり、酵素の安定化に役立つ適当な添加剤を加えることができる。例えば、アルブミン、カゼイン等の蛋白質や、酢酸、クエン酸、リン酸等の緩衝剤、塩化カルシウムその他の中性塩を挙げることができる。

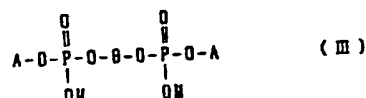
反応モル比、ホスホリパーゼDの使用量、溶媒の使用量等は、適宜に選択できる。例えば、反応モル比としては、原料リン脂質1モルに対して通常、多価アルコール約0.1~100倍モルを用いることが好ましい。ホスホリパーゼDの使用量は、原料リン脂質1g当り約10~100000単位、好ましくは約100~10000単位を例示することができる。さらに、溶媒の使用量としては、原料リン脂質に対して約2~100倍程度を例示できる。

天然リン脂質由来の分布を持つホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン及びその塩等と、多価アルコールとして、平均分子量400のポリエチレングリコール、平均分子量600のポリエチレングリコール、平均分子量200のポリプロピレングリコール、平均分子量500のポリグリセリン、平均分子量750のポリグリセリンやフルクトース、サッカロース、セロビオース、ラクトース、マルトース、リブロース、フラクトース、ソルボース、スクロース、エリスリトール、リビトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、ガラクトチトール等をホスファチジル基転移活性を有するホスホリパーゼDの存在下、反応させて得られる生成物等が挙げられる。

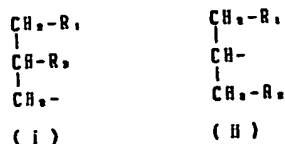
ここで示されたリポソーム形成剤を得るためのホスファチジル基転移活性を有するホスホリパーゼDについては、転移活性を有するものであれば特に限定されず、例えば、日本生化学会編、「続生化学実験講座、(東京化学同人)、第3巻、

反応温度、反応時間も適宜に選択できるが、好ましくは、約20~60℃、約1~72時間を例示できる。

本反応においては、前記多価アルコールの一級アルコール基部分に対して、ホスホリパーゼDによるホスファチジル基の転移が生起する。従って、本反応によって得られたリン酸エステル混合物(a)には、次の一般式(III)で表わされるジリン酸エステル及び一般式(IV)で表わされるモノリン酸エステルの両者が含有されている。



〔式中、Aは下記(1)及び/又は(2)の基を示し、



(i)

(ii)

(ここで、 R_1 及び R_2 は前記と同じ意味を有する)
 R は多価アルコール(i)~(iii)より2個の水酸基を除いた基を示し、 M は前記と同じ意味を有する)

また、本発明に用いられるリン酸エステル混合物(a)においては、前記グリン酸エステル(III)とモノリン酸エステル(IV)との比は、重量比で1:99~99:1が好ましい。

本発明において用いるリン酸エステル混合物(a)は、上記反応が終了後何ら精製することなく、例えば反応液を直接、もしくは濃縮乾固して用いることができるが、反応液の濃縮乾固物が好ましい。

本発明の目的のための水溶性塩としては、室温において 10^{-4}M 以上水に溶解する無機塩又は有機塩が好ましい。無機塩としては、例えば、対イオンとしてアルカリ金属、アンモニウムイオン等を有する、塩酸、硝酸、硫酸、リン酸、炭酸、臭

素酸、ヨウ酸等の塩、好ましくは、臭化カリウム、塩化カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、硫酸カリウム、ヨウ化カリウム、硝酸カリウム、臭化リチウム、塩化リチウム、ヨウ化リチウム、硝酸リチウム、硫酸リチウム、臭化アンモニウム、塩化アンモニウム、炭酸アンモニウム、炭酸水素アンモニウム、リン酸二水素アンモニウム、リン酸水素二アンモニウム、ヨウ化アンモニウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、臭化ナトリウム、炭酸ナトリウム、塩化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、硝酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、硫酸ナトリウム等が挙げられる。有機塩としては、例えば、アルカノールアミンの塩酸、硫酸、リン酸等の塩、又は、対イオンとしてアルカリ金属イオン、アンモニウムイオン等を有する、安息香酸、酢酸、サリチル酸、シュウ酸、フタル酸、グルコン酸、1-ナフタレンスルホン酸、2-ナフタレンスルホン酸、酒石酸、マレイン酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、

プロピオン酸、アスコルビン酸、マンデル酸、リンゴ酸、クエン酸等の塩、好ましくは、塩化トリエタノールアンモニウム、リン酸二水素トリエタノールアンモニウム、硫酸トリエタノールアンモニウム、安息香酸ナトリウム、安息香酸カリウム、安息香酸アンモニウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸アンモニウム、サリチル酸ナトリウム、サリチル酸カリウム、サリチル酸アンモニウム、シュウ酸カリウム、シュウ酸ナトリウム、シュウ酸アンモニウム、フタル酸ナトリウム、フタル酸カリウム、フタル酸アンモニウム、グルコン酸カリウム、グルコン酸アンモニウム、グルコン酸ナトリウム、1-ナフタレンスルホン酸アンモニウム、2-ナフタレンスルホン酸カリウム、2-ナフタレンスルホン酸アンモニウム、2-ナフタレンスルホン酸ナトリウム、酒石酸カリウム、マレイン酸ナトリウム、マレイン酸カリウム、マロン酸ナトリウム、コハク酸ナトリウム、フマル酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、プロピオン酸トリエタノールアンモニウム、アスコルビ

ン酸ナトリウム、アスコルビン酸トリエタノールアンモニウム、アスコルビン酸カリウム、マンデル酸ナトリウム、リンゴ酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、クエン酸トリエタノールアンモニウム等が挙げられる。より好ましい塩としては、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸ナトリウム等が挙げられる。

リン酸エステル混合物(a)によるリボソーム形成はこれらの水溶性塩を溶解した水中において形成され得るが、この時の水溶性塩濃度としては $10^{-4}\sim 1\text{M}$ 、なかでも $10^{-3}\sim 0.1\text{M}$ 濃度で行うのが特に好ましい。

本発明に界面活性剤を用いる場合、界面活性剤としては、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤及び両性界面活性剤のいずれでもよく、その種類及び配合量は、なんら限定されるべきものではないが、好ましくは界面活性剤(a)とリン酸エステル混合物(a)とを(a)に含まれるリン原子のモル数)/(a)のモル

数)が $10^{-4} \sim 10^0$ 、特に $0.1 \sim 100$ 程度となるように加えるのが好ましい。

アニオン性界面活性剤としては、例えば、アルキル硫酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩、ステアリン酸塩、パルミチン酸塩、ミリスチン酸塩、オレイン酸塩、ヘキサデカジエン酸塩、ヘキサデカトリエン酸塩、ヘキサデカテトラエン酸塩、リノール酸塩等のオクタデカジエン酸塩、リノレン酸塩等のオクタデカトリエン酸塩、アラキドン酸塩等のエイコサテトラエン酸塩、エイコサペンタエン酸塩、ドコサヘキサエン酸塩、アルキルリン酸塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、ジアルキルリン酸塩等、好ましくは、ジセチルリン酸ナトリウム、ジセチルリン酸トリエタノールアンモニウム、2-デシルテトラデシルリン酸ナトリウム等が挙げられる。

カチオン性界面活性剤としては、例えば、モノアルキルトリメチルアンモニウム塩やジアルキルジメチルアンモニウム塩等、好ましくは、セチル

トリメチルアンモニウムブロマイドやジステアリルジメチルアンモニウムクロライド等が挙げられる。

非イオン性界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、グリセリンアルキルエーテル、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルアミン、フラクトース又はグルコース等の脂肪酸エステル等が挙げられ、好ましくは、9-メチルヘプタデシルグリセリルエーテル、ソルビタンモノステアレート、オレイン酸グリセロールエステル、蔗糖脂肪酸エステル等が挙げられる。また、コレステロール等非常に疎水性の高い化合物も非イオン性界面活性剤に含めて考えることができる。

両性界面活性剤としては、例えば、アルキルベタイン、ホスホベタイン、スルホベタイン、天然及び合成のホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミン等、好ましくは、ステアリルホスホベタイン、ジパルミトイルホスファチジルコリン等が挙げられる。

本発明において、リン酸エステル混合物(a)並びに水溶性の塩及び/又は界面活性剤(b)を分散させるべき水は、リン酸エステル混合物(a)に対し、好ましくは $10 \sim 10^4$ 重量倍程度、より好ましくは $20 \sim 10^5$ 重量倍程度となるよう使用するのが適している。

本発明における小さなリポソームの形成方法は、リン酸エステル混合物(a)並びに水溶性の塩及び/又は界面活性剤(b)を適量の水中に投入し、緩やかに攪拌することによる。リポソーム調製時の温度は室温でよいが、一般に、 $40 \sim 80^\circ\text{C}$ で行った方が効率はよい。また、リン酸エステル混合物(a)並びに水溶性の塩及び/又は界面活性剤(b)の水の中への投入操作において、その投入方法及び投入

順序は制限されない。例えば、水溶性の塩及び/又は界面活性剤をあらかじめリン酸エステル混合物(a)と混合しておいてもよいし、まず塩水溶液及び/又は界面活性剤(b)の分散液をつくり、後からリン酸エステル混合物(a)を投入してもよい。

従来の方法により形成されたリポソームの平均直径は、普通 $1 \sim 5 \mu\text{m}$ であるが、本発明のリポソーム形成剤を用いると、平均直径 500 nm 以下の小さなリポソームをつくるのが可能である。

本発明において、リン酸エステル混合物(a)と水溶性塩及び/又は界面活性剤(b)とを、上記の方法で含有せしめれば、水溶液中で安定な小粒径リポソームを形成できるリポソーム組成物を提供することができる。

本発明においてリポソーム中に含有する活性成分は、疎水性物質でも親水性物質でもよく、または両者の混合物でもよい。

このような活性成分としては、例えば、ビタミンA、B₁、B₂、B₆、B₁₂、C、D、E、H、K、M、Q、パントチニールアルコール、パント

テン酸カルシウム、ニコチン酸ベンジル、ヘスペリジン、ヘスペリチン等のビタミン類とその誘導体、グリセリン、ニトログリセリン、ジグリセリド、トリグリセリド等のポリオール類とその誘導体、グルコース、フルクトース、ソルビトール、ガラクトース、マンノース、イノシトール、マルチトール、マルトース、ラクトース、スクロース、トレハロース、セロビオース、アデニルチオメチルペントース等の糖類とその誘導体、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸等の多糖類とその誘導体、グルコース-1-リン酸、グルコース-6-リン酸、マンノース-6-リン酸、ガラクトース-6-リン酸、フルクトース-6-リン酸、グルコース-1, 6-2リン酸、フルクトース-1, 6-2リン酸、フルクトース-2, 6-2リン酸等、又はそれらのナトリウム、カリウム等のアルカリ金属塩等の糖リン酸エステルとその誘導体、アラニン、ロイシン、リジン、アスパラギン、アスパラギン酸、シスチニン、プロリン、グルタミン、セリン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、

ストラジオール、サリチル酸及びその誘導体、塩酸ジフェンドラミン、イソプロピルメチルフェノール、塩化クロルヘキシジン、アラントインクロルヒドロキシアルミニウム、ホモスルファミン、スコボラミン、クロニジン、硫酸イソソルビド、5-フルオロウラシル、塩化カプロニウム、アセチルコリン等が挙げられる。

本発明における活性成分の濃度はなんら限定されないが、リポソーム形成に用いる水に対し、 10^{-2} ~30重量%程度が好ましい。

活性成分の投入方法としては、有機リン化合物並びに水溶性の塩及び/又は界面活性剤の混合物に活性成分を混合してもよいし、また、水中にあらかじめ活性成分を溶かしておいてもよい。更に、塩水溶液又は界面活性剤の分散液中に混合しておいてもよい。

【実施例】

次に実施例により本発明を説明するが、これらの実施例、参考例及び比較例はなんら本発明を限定するものではない。

チロシン、イソロイシン、バリン等のアミノ酸とその誘導体、コレステロール及びその誘導体、セラミド及びその誘導体、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸、プロスタグランジン、プロスタサイクリン、ロイコトリエン等の多不飽和脂肪酸及びその誘導体、ピロリドンカルボン酸、グリチルリチン、ピサボロール、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、パラベンエステル、メントール、レゾルシン、ヒノキチオール、スクワレン、アントラニル酸、尿素、副腎皮質ホルモン、卵胎ホルモン、エストロゲン、アンドロゲン、チロキシン、副下垂体ホルモン、副下垂体後葉抽出物、甲状腺ホルモン、胎盤性ゴナドトロピン、 ϵ -アミノカプロン酸、アラントイン、ハロカルバン、カンフル、塩化ヒドロキシアンモニウム、グルタオチンとその誘導体、メチル-2, 5-ジイソプロピル桂皮酸エステル、パラ-2, 5-ジイソプロピル桂皮酸エステル、ビス(2-ピリジルチオール-1-オキシド)亜鉛、アミノフェノール、阻害ヒスタミン剤、エストラジオール、エチルエ

参考例 1

反応器にジバルミトイルホスファチジルコリン12g、塩化ナトリウム4.8g、平均分子量が400のポリエチレングリコール25g、ホスファチジル基転移活性を持つホスホリパーゼD(例えばActinonadara属由来)1200ユニット、ジエチルエーテル120ml及び水100mlを入れ、30℃で24時間攪拌混合した。反応終了後、クロロホルムとメタノールを加えて脂質を抽出した。得られた沈殿11.5gを200mlのアセトンに溶解し、遠心分離して沈殿を除去した後、溶液を濃縮乾燥して9.9gの白色沈殿を得た。

得られた白色沈殿は¹H-NMR、元素分析及びIRにて分析したところ、ジリン酸エステル(Ⅲ)体37重量%、モノリン酸エステル(Ⅳ)体58重量%、ホスファチジルコリン4重量%及びホスファチジン酸1重量%を含有する混合物であった。

参考例 2

反応器にジバルミトイルホスファチジルコリン15g、塩化ナトリウム6.0g、平均分子量750

のポリグリセリン75g、ホスファチジル基転移活性を持つホスホリパーゼD1500ユニット、ジエチルエーテル150ml及び水150mlを入れ、30℃で24時間攪拌混合した。反応終了後、参考例1と同様に抽出、遠心し、14.1gの反応物を得た。

得られた白色沈殿は¹H-NMR、元素分析及びIRにて分析したところ、ジリン酸エステル(Ⅲ)体38重量%、モノリン酸エステル(Ⅳ)体55重量%、ホスファチジルコリン6重量%及びホスファチジン酸1重量%を含有する混合物であった。

実施例1

0.01M硫酸ナトリウム水溶液にグルコース濃度が0.056Mとなるようにグルコースを溶かし、グルコース-塩水溶液を調製した。参考例1で得られた白色沈殿80mgに前記グルコース-塩水溶液6gを加え、湯浴上約50℃に加熱しつつマグネティックスターラーで攪拌した。均一に分散した後、攪拌しつつ室温に戻したところ、濁りくもっているがほとんど透明なリボソーム溶液が得られた。

した後、攪拌しつつ室温に戻したところ、再び白濁したリボソーム溶液が得られた。この溶液について測定されたリボソームの平均直径は131nmであった。このリボソーム溶液は室温で約2週間変化せず安定であった。

この溶液を実施例1と同様にしてゲル濾過を行い、リボソームの溶出している分画について、グルコース濃度とリン濃度を定量したところ、このリボソームのトラップ体積はリンのモル当りで0.22 μ lであった。

比較例1

リボソーム形成剤として、ジパルミトイルホスファチジルコリンを用い、これを実施例1と同様にして0.056Mグルコース-0.01M硫酸アンモニウム塩水溶液に混合し、湯浴上約50℃に加熱しつつマグネティックスターラーで攪拌した。均一に分散した後、攪拌しつつ室温に戻したところ、白濁したリボソーム溶液が得られた。

この溶液を室温で約30分間静置しておくと、白色の沈殿を生じ、リボソームの安定性に乏しい

この溶液について、粒径測定機(サブミクロン粒子分析装置、Coulter社製モデルN4)を用いて測定したリボソームの平均直径は88nmであった。また、このリボソーム溶液は室温で約1ヶ月間変化せず、安定であった。

この溶液をセファデックスG50-メチウムを用いて室温でゲル濾過し、リボソームとリボソームに保持されなかったグルコースを分離した。

リボソームの溶出している分画についてグルコース濃度と有機リン化合物濃度を定量し、得られたリボソームのトラップ体積を有機リン化合物に含まれるリン原子のモル当りで表すと、0.023 μ l/molであった。

実施例2

0.02M硫酸アンモニウム水溶液に、グルコース濃度が0.056Mとなるようにグルコースを溶かし、グルコース-塩水溶液を調製した。参考例1で得られた白色沈殿50mgに、前記グルコース-塩水溶液5gを加え、湯浴上約50℃に加熱しつつマグネティックスターラーで攪拌した。均一に分散

ことが判った。また、この沈殿を光学顕微鏡で観察すると、粒子直径は1~5 μ mであり、小粒径のリボソームは形成しなかった。

実施例3

リボソームの形成を電子顕微鏡観察により確認した。30mgの実施例1で得られた白色沈殿を0.01Mの硫酸アンモニウム水溶液3mlに溶解した。この溶液について、リン-タングスタン酸を染色剤として染色し、透過型電子顕微鏡観察を行ったところ、平均直径101nmの一重のリボソームが見られた。このリボソームの直径は、粒径測定機を用いて測定した値とよく一致していた。

実施例4

ジパルミトイルホスファチジルコリンとP86400から得られた白色沈殿を1重量%相当量、水溶性塩として0.01M相当量の硫酸ナトリウム、活性成分として0.056M相当量のビタミンCを用い、実施例1と同様にしてリボソーム分散液を得た。

このリボソームの平均粒径は305nmであり、ゲル濾過による精製後、得られたリボソームのト

ラップ体積はリンのモル当り、 0.31 g/mol であった。

実施例 5

参考例 2 で得られた白色沈殿を 1 重量%、水溶性塩として 0.02M 相当の硫酸アンモニウム、活性成分として 1 重量% のグリセリンを用い、実施例 1 と同様にしてリボソーム分散液を得た。

このリボソームの平均粒径は 145 nm であり、得られたリボソームのトラップ体積はリンのモル当りで表わすと、 0.22 g/mol であった。

実施例 6

大豆リン脂質由来の脂肪酸組成を有するホスファチジルコリンと平均分子量が 200 のポリプロピレングリコールからホスファチジル基転移活性を持つホスホリパーゼ D の反応により得られた混合物を 1 重量%、水溶性塩として 0.02M 塩化トリエタノールアンモニウム、活性成分として 0.056M のグルコースを用い、実施例 1 と同様にしてリボソーム分散液を得た。

このリボソームの平均粒径は 247 nm であり、

参考例 1 で得られた白色沈殿を 0.94 重量%、界面活性剤として 0.18 重量% のジセチルリン酸トリエタノールアンモニウム、活性物質として 0.543M のグリセリンを用い、実施例 7 と同様にリボソーム水溶液を調製した。

得られたリボソームの平均直径は 239 nm 、トラップ体積はリンのモル当り、 0.17 g/mol であった。

実施例 9

卵黄由来の脂肪酸組成を有するホスファチジルコリンと平均分子量 500 のポリグリセリンを、ホスファチジル基転移活性を有するホスホリパーゼ D の存在下、反応して得られた生成物を 0.81 重量%、界面活性剤として 0.39 重量% のジパルミトイルホスファチジルコリン、活性物質として 0.133M のグリシンを用い、実施例 7 と同様にリボソーム水溶液を調製した。

得られたリボソームの平均直径は 208 nm 、トラップ体積はリンのモル当り、 0.37 g/mol であった。

ゲル濾過による精製後、得られたリボソームのトラップ体積は、リン当り 0.28 g/mol であった。

実施例 7

参考例 1 で得られた白色沈殿 30 mg と 2-デシルテトラデシルリン酸ナトリウム 25 mg をクロロホルム-メタノール ($2:1$) 混合溶媒に溶かし均一溶液とした後、減圧濃縮乾固して有機溶媒成分を完全に除去した。こうして得た均一な固型物に、 0.167M 尿素水溶液 3.5 g を加え、湯浴上約 50°C に加温しつつマグネティックスターラーで攪拌した。均一分散した後、攪拌しつつ室温に戻したところ、薄青く濁ってはいるがかなり透明なリボソーム溶液が得られた。この溶液のリボソームの平均直径は 271 nm であった。

この溶液を実施例 1 と同様にしてゲル濾過した。リボソームの溶出している分画についてリンと尿素的定量を行いその結果、得られたリボソームのトラップ体積はリンのモル当り、 0.16 g/mol であった。

実施例 8

【発明の効果】

本発明のリボソーム形成剤は、水と混合し、攪拌しただけで自然に粒径の小さなリボソームを形成することができる。本発明を用いて製造した小さなリボソームは、従来の方法によって製造したもの（例えば超音波照射により得られたもの）よりも安定である。また、本発明による粒径の小さなリボソームの製造法は、簡便で、従来の方法に必要な機械的操作や界面活性剤の除去等に煩わされることがない。すなわち、本発明は、従来の課題であった、リボソームの大きさ、大量生産性、保存安定性にたいする問題点をすべて解決しているもので、その利用価値は大きく、医薬品等に用いることができる。

以上